



(21)申请号 201910084995.7

(22)申请日 2019.01.29

(71)申请人 中国医学科学院输血研究所

地址 610052 四川省成都市成华区华彩路
26号

(72)发明人 刘鱼 付萍 吴秉婷 柯玲
李天成

(74)专利代理机构 成都九鼎天元知识产权代理
有限公司 51214

代理人 刘小彬

(51)Int.Cl.

G01N 33/576(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页

(54)发明名称

一种戊肝IgG抗体的检测方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种戊肝IgG抗体的检测方法及试剂盒,解决了现有技术中灵敏度低、特异性不好的问题。本发明的检测方法,包括以下步骤:抗原包被;封闭;第一步温育反应;第二步温育反应;向反应板的每个微孔中加入生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体和链霉亲和素标记的吖啶酯,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;化学发光测定。本发明的试剂盒,包括包被反应板、标记物、信号生成物、阴性对照、阳性对照。本发明设计科学,方法简单,通过引入生物素链霉亲和素信号放大系统,使用吖啶酯类化学发光物质,可有效增强免疫复合物与发光物质结合,极大地提高了灵敏度。

1. 一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤1. 抗原包被:将HEV基因重组抗原溶解于包被缓冲液后,再将反应板置于该包被缓冲液中,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;

步骤2. 封闭:将经步骤1处理后的反应板用封闭缓冲液封闭,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤,而后干燥;

步骤3. 第一步温育反应:在经步骤2处理后的反应板的微孔中先加入样本稀释液,然后将样品、阴性对照、阳性对照按顺序加入相应的微孔中,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;

步骤4. 第二步温育反应:向经步骤3处理后的反应板的每个微孔中加入生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体和链霉亲和素标记的吖啶酯,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;

步骤5. 化学发光测定:向经步骤4处理后的反应板的每个微孔中加入激发剂A和激发剂B,进行化学发光反应,测定发光强度。

2. 根据权利要求1所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述步骤1中,HEV基因重组抗原包被浓度为500-1000ng/1mL,包被体积为100 μ L/孔包被缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述激发剂A为HNO₃,激发剂B为曲那通100。

4. 根据权利要求1所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述步骤1中的孵育条件为25-40℃静置12-24小时;所述步骤2中的孵育条件为37 \pm 1℃静置1-2小时;所述步骤3中的孵育条件为37 \pm 1℃温育60 \pm 2分钟;所述步骤4中的孵育条件为37 \pm 1℃温育60 \pm 2分钟。

5. 根据权利要求1所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述阴性对照为灭活阴性人血浆,用于验证临床标本的无反应性。

6. 根据权利要求1所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述阳性对照为灭活人HEV-IgG抗体阳性血浆,用于验证临床标本的有反应性。

7. 根据权利要求1所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述HEV基因重组抗原包括通过基因工程技术制备的戊型肝炎病毒基因重组抗原,或通过合成方法制备的戊型肝炎病毒基因重组抗原。

8. 根据权利要求7所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,其特征在于,所述HEV基因重组抗原,来源ORF2(112-608),以HEV病毒侵染细胞后得到的细胞培养产物、以原核生物或真核生物为表达载体根据基因工程而得到的HEV基因重组抗原。

9. 一种戊肝IgG抗体检测试剂盒,其特征在于,包括以下组分:

包被反应板:包被了HEV基因重组抗原的固相材料;

标记物:用生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体;

信号生成物:链霉亲和素标记的吖啶酯类化合物;

阴性对照:灭活阴性人血浆,用于验证临床标本的无反应性;

阳性对照:灭活人HEV-IgG抗体阳性血浆,用于验证临床标本的有反应性。

10. 根据权利要求9所述的一种戊肝IgG抗体检测试剂盒,其特征在于,所述固相材料选自聚苯乙烯乳胶、聚苯乙烯塑料、聚氯乙烯塑料、脂质体、免疫磁性微珠中的任意一种。

一种戊肝IgG抗体的检测方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于临床检测分析方法技术领域,具体涉及一种戊肝IgG抗体的检测方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 戊型肝炎是由戊型肝炎病毒(Hepatitis E virus,HEV)引起的一种自限性的感染性急性肝炎。经粪、口途径传播的急性肠胃道传染病,主要流行于亚洲、非洲和拉丁美洲等发展中国家和地区。临床表现与甲型病毒性肝炎类似,但容易出现黄疸,病情较重,病程较长,病死率1%~4%,对孕妇、老年人和慢性肝炎患者的危害尤其严重。戊型肝炎多发生于发展中国家,据世界卫生组织(WHO)报道,全球每年大约有2000万人感染戊型肝炎,约350多万急性戊肝病例,5.66万死亡。我国是戊型肝炎高流行区,自1997年国家传染病疫情报告系统开始分型报告戊肝,已报道10余起暴发流行。随着国内卫生条件的改善和人民生活水平的提高,现主要以散发及局部暴发为主。由于猪是基因三型和四型HEV的主要宿主,猪源性的HEV也可以传染给人,因此戊型肝炎也是人畜共患疾病。事实上目前国内散发戊肝病例大多是动物源性感染。

[0003] 近年来,越来越多的报道显示HEV可以通过输血进行传播,且普通人群和献血者中HEV的血清学流行率出现上升趋势。英国,美国,西班牙地区献血者HEV血清学流行率达10-20%之间在,高流行区如韩国,荷兰、法国、意大利阿布鲁佐地区、日本等HEV血清学流行率高达20%以上,我国已有报道的江苏和浙江地区HEV血清学流行率接近40%。HEV感染正成为危害大众健康的重要问题之一。

[0004] HEV是无包膜单股正链RNA病毒,病毒颗粒直径约27~34nm。基因组长约7.5kB,由5'非编码区、编码区和3'非编码区组成。编码区包括3个开放读码框架(ORF)。ORF1位于基因组的5'端,长5,079bp,为非结构区基因,编码病毒复制所需要的RNA聚合酶、蛋白酶和解旋酶等;ORF2及ORF3位于基因组的3'端,ORF2长1,980bp,编码病毒的结构蛋白;ORF3长369bp,含有可被中和抗体所识别的抗原表位。随着戊型肝炎病毒分子克隆技术的成功建立,以重组蛋白作为抗原来检测HEV抗体的技术正在逐步完善,同时HEV的生物学性状也在进一步了解中。

[0005] 吖啶酯类化合物作为一种常用的化学发光试剂,具有高灵敏度、易标记蛋白、多肽和小分子上的优点;无需催化过程,也不需要增强剂,从而降低发光背景值,提高信噪比,减少干扰,是化学发光免疫分析的理想发光底物。目前已临床用于多种病毒抗原抗体检测项目中。国内外尚未有报道以链霉亲和素标记到吖啶酯类化合物上间接法测定戊型肝炎病毒IgG抗体的技术。目前市场上流通的戊型肝炎病毒IgG抗体检测试剂盒,大多灵敏度较低,且采用全抗原包被,特异性不好。因此,提供一种戊肝IgG抗体的检测方法,灵敏度高,特异性好,成为了本领域技术人员亟待解决的问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的之一在于,提供一种戊肝IgG抗体的检测方法,解决现有技术中灵敏度低、特异性不好的问题。

[0007] 本发明的目的之二在于,提供一种戊肝IgG抗体检测试剂盒。

[0008] 本发明采用的技术方案如下:

[0009] 本发明所述的一种戊肝IgG抗体的检测方法,包括以下步骤:

[0010] 步骤1.抗原包被:将HEV基因重组抗原溶解于包被缓冲液后,再将反应板置于该包被缓冲液中,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;

[0011] 步骤2.封闭:将经步骤1处理后的反应板用封闭缓冲液封闭,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤,而后干燥;

[0012] 步骤3.第一步温育反应:在经步骤2处理后的反应板的微孔中先加入样本稀释液,然后将样品、阴性对照、阳性对照按顺序加入相应的微孔中,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;

[0013] 步骤4.第二步温育反应:向经步骤3处理后的反应板的每个微孔中加入生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体和链霉亲和素标记的吖啶酯,经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤;

[0014] 步骤5.化学发光测定:向经步骤4处理后的反应板的每个微孔中加入激发剂A和激发剂B,进行化学发光反应,测定发光强度。

[0015] 进一步地,所述步骤1中,HEV基因重组抗原包被浓度为500-1000ng/1mL,包被体积为100 μ L/孔包被缓冲液。

[0016] 进一步地,所述激发剂A为HNO₃,激发剂B为曲那通100。

[0017] 进一步地,所述步骤1中的孵育条件为25-40℃静置12-24小时;所述步骤2中的孵育条件为37 \pm 1℃静置1-2小时;所述步骤3中的孵育条件为37 \pm 1℃温育60 \pm 2分钟;所述步骤4中的孵育条件为37 \pm 1℃温育60 \pm 2分钟。

[0018] 进一步地,所述阴性对照为含磷酸盐、人血浆,用于验证临床标本的无反应性。

[0019] 进一步地,所述阳性对照为含磷酸盐、灭活人HEV-IgG抗体阳性血浆,用于验证临床标本的有反应性。

[0020] 进一步地,所述HEV基因重组抗原包括通过基因工程技术制备的戊型肝炎病毒基因重组抗原,或通过合成方法制备的戊型肝炎病毒基因重组抗原。

[0021] 进一步地,所述HEV基因重组抗原,来源ORF2(112-608),以HEV病毒感染细胞后得到的细胞培养产物、以原核生物或真核生物为表达载体根据基因工程而得到的HEV基因重组抗原。

[0022] 本发明所述的一种戊肝IgG抗体检测试剂盒,包括以下组分:

[0023] 包被反应板:包被了HEV基因重组抗原的固相材料;

[0024] 标记物:用生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体;

[0025] 信号生成物:链霉亲和素标记的吖啶酯类化合物;

[0026] 阴性对照:灭活阴性人血浆,用于验证临床标本的无反应性;

[0027] 阳性对照:灭活人HEV-IgG抗体阳性血浆,用于验证临床标本的有反应性。

[0028] 优选地,所述固相材料选自聚苯乙烯乳胶、聚苯乙烯塑料、聚氯乙烯塑料、脂质体、免疫磁性微珠中的任意一种。

[0029] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0030] (1) 本发明设计科学,方法简单,通过引入生物素链霉亲和素信号放大系统,使用吖啶酯类化学发光物质,可有效增强免疫复合物与发光物质结合,极大地提高了灵敏度,最低检出限可达0.039U。

[0031] (2) 本发明采用包被原料(HEV抗原)是以基因工程重组技术表达的HEV ORF2基因编码的结构蛋白片断,充分融合了目前广泛流行的戊型肝炎病毒I~IV型四种基因型优势抗原表位,因而对不同基因型戊型肝炎病毒均能检出,进一步提高了检测灵敏度。

[0032] (3) 由于本发明采用的包被抗原为含优势抗原表位的蛋白片段,相比全抗原包被,非特异性结合减少,从而提高了检测的特异性。

[0033] (4) 操作简便,反应时间短,吖啶酯类化学物在激发物作用下立即发光;

[0034] (5) 有利于反应体系的自动化操作。

具体实施方式

[0035] 本发明实施例中所述的试剂来源如下:

[0036] 生物素标记羊抗人IgG多克隆抗体工作液:购自abcam艾博抗(上海)贸易有限公司,保存于含2% (w/v) 脱脂奶粉的1% (v/v) PBST缓冲液,临用前1:10稀释使用。

[0037] 链霉亲和素标记的吖啶酯工作液:购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0038] 包被缓冲液:含0.05M Na₂CO₃-NaHCO₃液,PH为9.5;

[0039] 浓缩洗液:含0.2-1.0% (v/v) TWEEN-20的1% (v/v) PBS溶液,使用时用水稀释20倍,配制成洗涤缓冲液;

[0040] 封闭缓冲液:含5% (w/v) 脱脂奶粉的1% (v/v) PBST缓冲液;

[0041] 分析缓冲液:含2% (w/v) 脱脂奶粉的1% (v/v) PBST缓冲液;

[0042] 激发剂A:0.1M HNO₃,1% (v/v) H₂O₂;

[0043] 激发剂B:2% (v/v) TritonX-100,0.25M NaOH;

[0044] 样本稀释液:含2% (w/v) 脱脂奶粉的1% (v/v) PBST缓冲液;

[0045] 阴性对照:灭活阴性人血浆,用于验证临床标本的无反应性;

[0046] 阳性对照:灭活人HEV-IgG抗体阳性血浆,用于验证临床标本的有反应性。

[0047] 实施例1

[0048] 本发明公开了HEV-基因重组抗原的制备方法,具体如下:

[0049] (1) ORF2全长基因扩增:采用RNAzol (Biotecx Laboratories, Inc., Houston, Tex) 提取HEV病毒全RNA,再用Oligotex-dT30 (Super) (Roche Diagnostic Systems, Tokyo, Japan) 将poly (A) -RNA反转录成cDNA。采用PCR方法扩增ORF2全长片段引物信息如下:

[0050] HEV-D2:59-TGGGTTCGCGACCATGCGCCCTCG

[0051] HEV-U2:CAACAGAAAGAAGGGGGGCACAAG

[0052] (2) 构建质粒:PCR产物随后转录至pCRII (Invitrogen, San Diego, Calif) 中,从而得到pHEV5134/7161质粒。用限制性内切酶NruI和XbaI消化pHEV5134/7161。

[0053] (3) 构建表达载体:以pHEV5134/7161质粒为模板,PCR扩增ORF2(aa112-608) 表达基因, QIAGEN PCR产物纯化试剂盒 (QIAGEN, Valencia, CA) 提纯、内切酶消化PCR产物后转染至杆状病毒表达载体pVL1393 (Pharminogen, San Diego, CA) 中。引物信息如下:

[0054] HEV-F:AAGGATCCATGGCGGTGCTCCAGCCCATGACACCCCGCCAGT,

[0055] HEV-R:AATCTAGACTATGCTAGCGCAGAGTGGGGGGCTAAAA。

[0056] (4) VPL的表达及纯化:采用脂质体(Gibco BRL,Gaithersburg,MD)按照试剂盒说明书方法将表达载体和线性化野生型加利福尼亚自体核多角体病毒感DNA(Pharmingen)共转染至Sf9(保藏号为GDC008,中国典型培养物保藏中心)细胞,28℃培养于T25培养基中。

[0057] 取Sf9载体培养冻融物感染Tn-5细胞(保藏号为GDC0293,中国典型培养物保藏中心),收集上清液与沉淀10000g 4℃离心90min,去除细胞碎片。离心后的上清液采用Beckman SW28转子25000rpm 4℃离心2h,使用4.5ml培养基4℃过夜后加入1.95g氯化铯混匀。35000r/min 4℃离心24h。注射器针头穿刺离心管,收集分离各蛋白条带。用培养基稀释,45000r/min离心4℃24h去除沉淀氯化铯,得到纯化的HEV基因重组抗原。

[0058] 实施例2

[0059] 本实施例公开了本发明的HEV-基因重组抗原包被板的制备:

[0060] 其中,HEV基因重组抗原为采用按照实施例1的方法制成;

[0061] 固相载体(白色96孔微孔板):购于美国康宁公司。

[0062] 具体的制备步骤如下:

[0063] (1)包被:将HEV基因重组抗原溶解于包被缓冲液后,再将反应板置于该包被缓冲液中,在25-40℃静置12-24小时,注意防止水分蒸发;其中,HEV基因重组抗原包被浓度为500-1000ng/1mL,包被体积为100μL/孔包被缓冲液;

[0064] (2)封闭:包被孵育完成后,用洗涤缓冲液洗涤两次后,加入封闭缓冲液200μL/孔,37℃静置1-2小时;其中,洗涤缓冲液的用量为400μL/孔;

[0065] (3)吸干封闭缓冲液并甩干;

[0066] (4)将甩干的反应板放入真空干燥机,室温,真空度小于50帕,抽干3.5小时,停机;

[0067] (5)将干燥后反应板装入铝箔袋并热封,做好标识,放置2-8℃保存。

[0068] 实施例3

[0069] 本实施例公开了利用实施例2制得的HEV-基因重组抗原包被板检测戊肝IgG抗体方法,具体为:

[0070] (1)配液:将浓缩洗液加水稀释20倍后,作为洗涤缓冲液备用;

[0071] 将阴性对照、阳性对照、样本稀释液、分析缓冲液、所需数量的微孔反应板和待测样品平衡至18-28℃,并将液体试剂振荡混匀;

[0072] (2)将样品对应微孔按序编号,每板微孔反应板设抗-HEV IgG阴性对照和阳性对照各2孔;

[0073] (3)第一步温育反应:微孔反应板的每个微孔中先加入样本稀释液90μL,然后按编号加入待测样品(人类血浆或血清)、阴性对照、阳性对照各10μL,振荡混匀,用封板膜封板后,置37±1℃温育60±2分钟;

[0074] (4)用洗涤缓冲液洗板5次,洗涤缓冲液的用量为400μL/孔;将板条在洁净的吸水纸上拍干;

[0075] (5)第二步温育反应:在每个微孔内加入50μL生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体工作液和50μL链霉亲和素标记吡啶酯类化学物工作液后,置37±1℃温育60±2分钟;

[0076] (6)用洗涤缓冲液洗板5次,洗涤缓冲液的用量为400μL/孔;将板条在洁净的吸水

纸上拍干；

[0077] (7) 化学发光测定：向经过步骤(6)处理后微孔中加入1% H_2O_2 +0.1M HNO_3 发光激发液A 50 μ L，立即放入全波长多功能微孔板检测仪(TECAN Infinite® M1000 PRO)内，调整一起自动加入0.25M NaOH+2% Triton100发光激发液B 50 μ L，反应0.9s检测各孔发光强度。下面表1为申请人生产的HEV-IgG试剂盒测国家标准物质最低检测限的实验数据，表2为申请人生产的HEV-IgG试剂盒检测临床已知阴性、阳性血浆样本实验数据。

[0078] 表1.最低检测限

[0079]

指标	标准品浓度	发光值	S/CO
----	-------	-----	------

[0080]

NC		608.33	1
PC		123758	203.44
S1	1U	57392	94.34
S2	0.5U	35665	58.63
S3	0.25U	29737	48.88
S4	0.125U	20214	33.23
S5	0.0625U	15427	25.36
S6	0.03125U	8597	14.13
S7	0.015625U	5502	9.04
S8	0.0078125U	2873	4.72
S9	0.00390625U	1494	2.46
S10	0.00195312U	853	1.40

[0081] 注：以S(样本测值)/N(阴性平均测值) ≥ 2.1 为阳性，其依据既是以参考血清的2.1倍作为CUT OFF值。

[0082] 表2.临床样本数据

[0083]

质量指标	指标	发光值	S/CO
	NC	9588	1
	PC	409548	42.72
批内精密性 CV (100%) 小于等于 10% (n=10)	精密性	404705	42.21
		419851	43.79
		412875	43.07
		409871	42.75
		413394	43.12
		413711	43.15
		408292	42.59
		399829	41.71
		410284	42.80
		405271	42.27
	批内 CV	1.38%	

[0084]

30 份阴性参考品 检测结果允许出 现一个假阳性	N1	5926	0.62
	N2	6365	0.66
	N3	3580	0.37
	N4	4552	0.47
	N5	13101	1.37
	N6	13814	1.44
	N7	5051	0.53
	N8	17625	1.84
	N9	13711	1.43
	N10	7703	0.80
	N11	5902	0.62
	N12	4867	0.51
	N13	11529	1.20
	N14	6429	0.67
	N15	6201	0.65
	N16	7912	0.83
	N17	7576	0.79
	N18	6227	0.65
	N19	9346	0.97
	N20	6210	0.65
	N21	7525	0.78
	N22	13082	1.36
	N23	12851	1.34
	N24	16643	1.74
	N25	4519	0.47
	N26	5257	0.55
	N27	2902	0.30
	N28	8792	0.92
	N29	8314	0.87

[0085]

	N30	6029	0.63
10 份阳性参考品 检测结果允许一 份检为阴性	P1	610054	63.63
	P2	271560	28.32
	P3	294744	30.74
	P4	130835	13.65
	P5	442912	46.20
	P6	541070	56.43
	P7	826520	86.21
	P8	1018760	106.26
	P9	573790	59.85
	P10	455106	47.47

[0086] 注：最低检出限可达0.039U。阴阳性参考品符合率及精密度参考品符合率均符合国家参考品质量标准，即阴性符合率 $\geq 29/30$ ，阳性符合率 $\geq 9/10$ ，重复性CV (%) $\leq 15\%$ 。

[0087] 以现有国家食品药品监督管理局注册证的、北京万泰生物药业股份有限公司生产的“戊型肝炎病毒IgG抗体诊断试剂盒(酶联免疫法)”[注册证号：国械准准20153401411]作为参比试剂，采用本发明方法同步检测HEV-IgG样本1000份。以参比试剂为相对标准，相对灵敏度(阳性符合率)为99.47%，相对特异性(阴性符合率)为99.06%，相对总符合率为99.21%。

[0088] 实施例4

[0089] 本实施例公开了本发明的戊肝IgG抗体的检测试剂盒的组成，至少包括以下组份：

[0090] 包被反应板：包被了HEV基因重组抗原的固相材料；

[0091] 标记物：用生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体；

[0092] 信号生成物：链霉亲和素标记的吖啶酯类化合物；

[0093] 阴性对照：灭活人阴性血浆，用于验证临床标本的无反应性；

[0094] 阳性对照：灭活人HEV-IgG抗体阳性血浆，用于验证临床标本的有反应性。

[0095] 其中，包被反应板的制备方法可采用实施例2的方法制备，其固相材料选自聚苯乙烯乳胶、聚苯乙烯塑料、聚氯乙烯塑料、脂质体、免疫磁性微珠中的任意一种。

[0096] 检测时所用到的浓缩洗液、分析缓冲液、样本稀释液，或/和激发剂A、激发剂B，可由使用者检测时自行配制，也可装于本发明的试剂盒中，作为本发明试剂盒的组份。

[0097] 综上所述，我们可以看到：引入生物素链霉亲和素信号放大系统的间接法化学发光试剂盒检测戊型肝炎病毒IgG抗体具有很高的戊型肝炎病毒IgG抗体的检测灵敏度。

[0098] 上述实施例仅为本发明的优选实施方式之一，不应当用于限制本发明的保护范围，但凡在本发明的主体设计思想和精神上作出的毫无实质意义的改动或润色，其所解决的技术问题仍然与本发明一致的，均应当包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种戊肝IgG抗体的检测方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN109765374A	公开(公告)日	2019-05-17
申请号	CN201910084995.7	申请日	2019-01-29
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院输血研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院输血研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院输血研究所		
[标]发明人	刘鱼 付萍 柯玲 李天成		
发明人	刘鱼 付萍 吴秉婷 柯玲 李天成		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/531 G01N33/68 G01N21/76		
代理人(译)	刘小彬		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种戊肝IgG抗体的检测方法及试剂盒，解决了现有技术中灵敏度低、特异性不好的问题。本发明的检测方法，包括以下步骤：抗原包被；封闭；第一步温育反应；第二步温育反应：向反应板的每个微孔中加入生物素标记的羊抗人IgG多克隆抗体和链霉亲和素标记的吖啶酯，经孵育操作后用洗涤缓冲液洗涤；化学发光测定。本发明的试剂盒，包括包被反应板、标记物、信号生成物、阴性对照、阳性对照。本发明设计科学，方法简单，通过引入生物素链霉亲和素信号放大系统，使用吖啶酯类化学发光物质，可有效增强免疫复合物与发光物质结合，极大地提高了灵敏度。

